

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

Solu- ja molekyylibiologia

2012

Jussi Leino

MENETELMÄVALIDOINTI

– Abbot Allele SEQR mikrokimera



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jussi Leino

MENETELMÄVALIDOINTI – ALLELE SEQR MIKROKIMERA

Akuutit leukemiat ovat klonaalisia, yhdestä varhaisesta kantasolusta lähtöisin olevia pahanlaatuisia verisairauksia. Allogeenisella kantasolusiirroilla (allo-HSCT) siirteen saajam kantasolut ja koko hematopoieesi korvataan siirteen luovuttajan terveillä kantasolusiirroilla, jolloin myös pahalaatuinen veritauti voidaan parantaa pysyvästi. Allogeenisen kantasolusiirron rajoittavana tekijänä ovat kuitenkin vakavat komplikaatiot kuten graft-versus-host tauti (GvHD). Hematopoieettisten kantasolujen siirroissa tavoitteena on täydellinen luovuttajan kimerismi. Usein kuitenkin potilaan solupopulaatio korvautuu hitaasti luovuttajan soluilla ja joskus, kuten taudin relapsin yhteydessä, potilaan omien solujen osuus voi alkaa kasvaa hoidon myöhemmässä vaiheessa. Kimerismitutkimuksessa seurataan potilaan luuytimen solupopulaatioita. Tällöin mahdollinen taudin relapoituminen on ennakoitavissa ja potilaan ennustetta voidaan parantaa.

Tutkimuksessa validoitiin qPCR-menetelmään perustuva kimerismianalyysi, Abbot Molecular Allele SEQR. Validoinnissa tutkittiin yhteensä yksitoista kantasolusiirteen luovuttaja ja saaja paria. Joukossa oli mukana sekä sisarluovuttajia että rekisteriluovuttajia. Uudella menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin vanhaan käytössä olevaan menetelmään. Tuloksista pystyttiin näkemään että uusi menetelmä oli huomattavasti herkempi verrattuna vanhaan. Useiden potilaiden näytteissä oli havaittavissa erittäin pientä sekakimerismiä, kun taas vanhalla menetelmällä tulos oli täydellinen luovuttajan kimerismi.

ASIASANAT:

LEUKEMIA, MOLEKYYLIGENETIIKKA, KANTASOLUSIIRTO, LUUYDINSIIRTO, KIMERISMI

Jussi Leino

METHOD VALIDATION – ALLELE SEQR MICRO CHIMERISM

Acute leukemias are clonal, beginning from one early stem cell, malignant blood disease. In allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT) the stem cells and complete hematopoiesis of the recipient is replaced by that of the donor. This may lead to permanent cure of the haematological malignancy. However the limiting factor in Allogeneic stem cell transplantation are the serious complications such as graft-versus-host disease(GvHD). Aim of hematopoietic stem cell transplantation is complete donor chimerism. However, often the patient's entire cell population is replaced by donor cells rather slowly and the proportion of recipient cells may start to increase even in later phases of treatment. Chimerism methods monitor the origin of patient's blood or bone marrow cell populations. This way the potential relapse of the disease can be predicted and the patient's prognosis can be improved.

This study was executed to validate a qPCR method based chimerism analysis Abbot Allele SEQR. A total of eleven donor and recipient pairs were studied for this validation. The samples included both sibling and unrelated matched donors. Results by the new method were compared to the old method previously used. Results suggested that the new method was significantly more sensitive than the old. Many patients samples showed very low mixed chimerism by Allele SEQR, whereas with the old method, the result was a complete donor chimerism.

KEYWORDS:

LEUKEMIA, GENETIC RESEARCH, STEM CELL TRANSPLANT, BONE MARROW TRANSPLANT, CHIMERISM

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI) SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 KANTASOLUSIIRTEET HEMATOLOGISTEN TAUTIEN HOITONA JA KIMERISMI	10
2.1 Kantasolu siirteet	10
2.2 Kimerismi	11
2.3 Kvantitatiivinen PCR	12
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	13
4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	14
4.1 Tutkimuksen kulku	14
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	15
4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökulmien tarkastelu	15
5 TULOKSET	17
6 POHDINNAT	24
LÄHTEET	25

LIITTEET

- Liite 1. Kaikki tulokset luetteloituna
Liite 2. Työohje

KUVAT

Kuva 1. Laimennossarja	19
------------------------	----

KUVIOT

Kuvio 1. Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä	15
Kuvio 2. Regressiosuora kaikista tuloksista	18
Kuvio 3. Potilaan 2 tulokset	18
Kuvio 4. Potilaan 4 tulokset	19
Kuvio 5. Potilaan 6 tulokset	20
Kuvio 6. Potilaan 11 tulokset	21
Kuvio 7. Potilaan 11. fragmenttianalyysin tulokset tasoilla 50% ja 87,5%	22
Kuvio 8. Potilaan 11. fragmenttianalyysin tulokset tasoilla 95% - 99,8%	23

TAULUKOT

<i>Taulukko 1. Menetelmän teoreettiset herkkyydet</i>	<i>17</i>
<i>Taulukko 2. Laimennossarjan tulokset</i>	<i>20</i>
<i>Taulukko 3. Rinnakkaisajojen tulokset</i>	<i>21</i>
<i>Taulukko 4. Potilaan 11 fragmenttianalyysin tulokset</i>	<i>22</i>

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

*Allogeeninen
kantasolusiirto*

Siirrossa käytetään terveen luovuttajan luuydintä joka on kudostyypiltään mahdollisimman samankaltaista saajan luuytimen kanssa. Siirre voi olla peräisin joko sukulaiselta tai rekisteriluovuttajalta.

Hematopoieesi

Verisolujen muodostuminen, mikä terveellä ihmisellä tapahtuu luuytimessä.

Käänteishyljintä (GvHD)

Siirteen valkosolut tunnistavat immuunipuutteisen isännän kudokset vieraiksi ja kehittävät immuunivasteen niitä kohtaan.

Kimerismi

Tutkimus jossa selvitetään siirteen saajasta ja luovuttajasta peräisin olevien solupopulaatioiden suhde.

CD34

Hematopoieettisten kantasolujen pinnalla sijaitseva glykoproteiini joka toimii solujen välisenä kiinnikkeenä.

T-Solu

Valkosoluhin kuuluva solu jolla on keskeinen rooli immuunipuolustuksessa

1 JOHDANTO

Akuutit leukemiat ovat klonaalisia, yhdestä varhaisesta kantasolusta lähtöisin olevia pahanlaatuisia verisairauksia. Suomessa todetaan vuosittain noin 200 uutta akuuttia leukemias, joista noin 150 aikuisilla ja 50 lapsilla. Akuuttien leukemioiden syy on suurelta osin tuntematon. Uskotaan että henkilön varhaisessa hematopoieettisessa kantasolussa on tapahtunut useita genettisiä vaurioita, jotka aiheuttavat leukemian kehittymisen. Suurinta osaa akuuteista leukemioista pidetään hankinnaisina, mutta muutama prosentti akuuteista leukemioista liittyy perinnöllisiin tekijöihin. (Elonen, 2007, 285)

Allogeeninen kantasolu (allo-HSCT) siirto on tällä hetkellä ainut parannuskeino hematopoieettisten kantasolujen taudeissa. Allogeenisen kantasolusiirron rajoittavana tekijänä ovat kuitenkin vakavat komplikaatiot kuten käänteishyljintä (graft-versus-host tauti, GvHD), jossa siirteen antaneen potilaan solut alkavat tuhota potilaan omia soluja. Kuitenkin ennalta ehkäiseviä immunosuppressiivisia hoitoja käytetään laajalti GvHD:n estämiseen. (Borchers ym. 2011, 829-841). Mikäli käänteishyljintä kohdistuu pääasiassa leukeemisiin tautisoluihin (graft-versus-leukemia, GVL), on ilmiö hyödyllinen taudin paranemisen kannalta.

Kimerismi-tutkimusta käytetään GvHD-efektin arviointiin ja mahdollisen jäännöstaudin diagnosoimiseen. Kimerassa kaksi genomiltaan eriävää solupopulaatiota sijaitsevat samassa. Kimerismia esiintyy muun muassa verensiirroissa, elinsiirroissa ja luuydinsiirroissa. Luuydinsiirroissa alkuperäisten solujen määrän seurannalla voidaan arvioida siirteen onnistumista ja suunnitella jatkohoitoja tarvittaessa. Hematopoieettisen kimeran mittaamisesta on tullut käytännöllinen keino sekä relapsin että liiallisen GvHD-efektin torjumiseksi kantasolusiirrepotilailla. (Jime´nez-Velasco ym. 2005, 336–343)

Relapsi on yleisin syy allogeenisen kantasolusiirron epäonnistumiselle. Siirteen saajan oman hematopoieesin säilyminen luovuttajasta peräisin olevan hematopoieesin rinnalla, eli sekakimerismi kasvattaa relapsin riskiä akuuttia leukemias sairastavissa potilaissa. Kimerismiseurannan avulla relapsi voidaan joissain tapauksissa ennustaa jopa kuukausia etukäteen. (Jime´nez-Velasco ym. 2005, 336–343)

Kimerismissä tutkitaan kantasolusiirteen tarttumista tai rejekoitumista. Kantasolusiirrossa pyritään täydelliseen luovuttajan kimerismiin, jolloin kaikki solut ovat peräisin luovuttajalta. Rutiinikäytössä olevassa analyysimenetelmässä ennen siirtoa otetuista saajan ja luovuttajan verinäytteistä monistetaan PCR-reaktion avulla seitsemän mikrosatelliittimarkeria, jotka kokoerotellaan kapillaarielektroforeettisesti. Seurantaan valitaan markerit saajan ja luovuttajan alleelikombinaatioiden perusteella. Seuranta tehdään kokoverinäytteen soluista ja CD3-vasta-aineella eristettyjen t-solujen DNA:sta. (Tykslab ohjekirja 2011)

Suomen Leukemiaryhmä on laatinut suositukset AML:n jäännöstaudin seurantaan. Luuydinnäytteestä tutkitaan morfologia sekä jäännöstauti kolmen kuukauden välien kahden vuoden ajan varsinaisen hoidon päättymisestä. Tämän jälkeen seurantaan riittää B-PVK-T. (AML seuranta ja vastearvio, Suomen Leukemiaryhmä 2012.)

2 KANTASOLUSIIRTEET HEMATOLOGISTEN TAUTIEN HOITONA JA KIMERISMI

2.1 Kantasolu siirteet

Kantasolujen siirroissa potilaalle annetaan hematopoieettisia kantasoluja korvaamaan veritaudin tai voimakkaan sytotoksisen hoidon vaurioittama vertamuodostava solukko. Siirroissa hyödynnetään solujen immunologisia vaikutuksia tautien parantamiseksi. Allogeenisissa siirroissa luovuttajana toimii toinen ihminen. Autologisissa siirroissa potilaalle annetaan häneltä itseltään aikaisemmin kerättyjä soluja tai luuydintä. (T. Ruutu, Veritaudit, s.492.)

Ennen kantasolujen siirtoa potilaalle pitää antaa esihoito. Esihoito koostuu solunsalpaajista ja joskus myös sädehoidosta. Allogeenisissa siirroissa tavoitteena on lamaannuttaa immunologista järjestelmää sekä tuhota tautisoluja. Immunologisen järjestelmän heikentyessä, riski siirteen hylkimisreaktioon pienenee. Esihoito suunnitellaan etukäteen potilaan kunnon ja taudin mukaan. (Harris ym,2012.)

Allogeenisessä siirroissa luovuttajalta vaaditaan hyvää kudasantigeenien yhteensopivuutta. Tämän vuoksi luovuttajaksi voi soveltua sukulainen, useimmissa tapauksissa sisarus. Ellei potilaan lähipiiristä löydy sopivaa luovuttajaa, voidaan luovuttajaa etsiä luuydinluovuttajarekisteristä. Potilaan ja luovuttajan tulee olla identtisiä vähintään HLA-A-, -B- ja -DR-kudasantigeneiltään. (Ruutu ym, Veritaudit, s.493)

Allogeeniseen siirtoon liittyy paljon komplikaatioita, koska se vaikuttaa vahvasti potilaan immunologiseen järjestelmään. HLA-identtisten sisarluovuttajien kesken siirteen hyljinnän riski on erittäin alhainen. Esihoidon intensiteetti vaikuttaa hyljintä riskiin. Allogeenisen siirron keskeisin komplikaatio on käänteishyljintä. Siirteen mukana potilaaseen siirtyy toimintakykyisiä T- ja NK-soluja, jotka voivat alkaa hylkimään potilaan omia kudoksia. Akuutin käänteishyljinnän tyypillisimmät oireet ovat ihottuma, ripuli, maksan vaurioituminen ja ne ilmaantuvat ensimmäisten viikkojen kuluttua siirrosta. Krooninen käänteishyljintä on taudinkuvaltaan kevyempi, oireina muun muassa ihon kuivuus, vähentynyt syljen erityys ja kuivat silmät. Akuuttia

käänteishyljintää esiintyy noin neljäsosalla potilaista ja kroonisen käänteishyljinnän oireita esiintyy noin puolelle potilaista. (Ruutu ym, Veritaudit, s.496)

Kantasolujen siirtoa käytetään monien pahanlaatuisten hematologisten tautien hoitoon kuten leukemiat, aplastinen anemia ja lymfooma. Luuydinsiirron onnistuminen riippuu luovuttajan siirteen tarttumisesta ja hematopoieesin elpymisestä. Yleisimmät komplikaatiot ovat taudin relaboituminen, siirteen hylkiminen tai graft-versus-host tauti. Hoidon onnistumista seurataan siirron jälkeen, jotta pystyttäisiin ennustamaan mahdollinen relapsi ja siirteen hyljintä. Kimerismissä määritetään luovuttajan ja vastaanottajan solumäärät, jolloin havaitaan mahdolliset komplikaatiot ja jäännöstaudin mahdollisuus. Kimerismin nopea ja luotettava seuraaminen on erityisen tärkeää potilaan hoidon suunnittelun kannalta. (Harris ym. 2012)

2.2 Kimerismi

Kimerismitekniikoita käytetään pääasiallisesti allogeenisen kantasolusiirteen saaneen potilaan seurantaan. Herkimmillä menetelmillä voidaan havaita jopa 10^{-4} (0,001 %) pitoisuuksia. Aiemmin potilaan solupopulaation kvantifiointiin käytettiin tavallisia PCR-menetelmiä yhdistettynä kapillaarielektroforeesiin. Nykyisin qPCR-pohjaiset menetelmät ovat kasvussa. Uudet qPCR-menetelmät ovat herkempiä, nopeampia, ja mahdollistavat analyysin pienistäkin näytemääristä. (Barrios ym. 2003, 801-810)

Kimerismin avulla voidaan ennustaa tehokkaasti siirteen tarttuminen ja mahdollinen hylkiminen. Kimerismistä voidaan myös helposti ennustaa mahdollinen relapsi ja aloittaa ennaltaehkäisevä lääkitys etukäteen. (Koldehoff ym, 2006, 735-746)

Kimerismianalyyseissa käytetään termejä täyskimerismi ja sekakimerismi. Täyskimerismillä (CC, complete chimerism) tarkoitetaan tilaa jossa saajan alleeleita ei ole enää havaittavissa. Sekakimerismissä (MC, mixed chimerism) potilaassa on sekä hänen omia että luovuttajan alleeleita. (Bacher ym, 2011, 310-319) Nykyisellä tavallisimmin kliinisissä kimerismitutkimuksissa käytettävällä mikrosatelliittianalyysillä päästään ainoastaan noin 1% herkkyyteen. (Masmam ym, 2005, 558-566)

Jäännöstaudin mittaamisen pääasiallinen tarkoitus on ennakoida taudin mahdollinen relapoituminen. Tällöin asianmukaiset hoidot voidaan aloittaa varhaisessa vaiheessa, jolloin niiden teho on parhaimmillaan. (Pelliniemi ym, Veritaudit, s.141)

Aiemmin kimerismianalyysit on tehty lähinnä erinäisin PCR-menetelmin tai fluoresenssi in situ hybridisaatiolla (FISH) niissä tapauksissa kuin saaja ja luovuttaja ovat olleet eri sukupuolta. (Alizadeh M, ym. 2002, 4618-4625)

2.3 Kvantitatiivinen PCR

Tutkimuksen keskeisenä menetelmänä käytetään Polymeraasiketjureaktiota (PCR). PCR:llä monistetaan DNA-jaksoja jotka sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun jakson välissä. PCR:llä on lukuisia käyttökohteita. Sillä voidaan esimerkiksi monistaa tiettyä aluetta pienestä määrästä näytettä ja käyttää sitä sairauden diagnostiikkaan. PCR-reaktiolla saadaan monistettua nopeasti suuria määriä DNA:ta. PCR:ssä käytetään kahta aluketta jotka sitoutuvat DNA:n eri juosteisiin, monistettavan alueen vastakkaisiin päihin. Väliin jäävä alue on jakso jota halutaan monistaa. (Suominen ym, 1997, 107-108)

PCR-reaktiossa tapahtuu kolme eri reaktiota; denaturointi, annealing ja pidennys. Yhtä tällaista sarjaa kutsutaan sykliksi. Denaturoinnissa lämpötilaa nostetaan niin että juosteet irtoavat toisistaan. Annealing-reaktiossa lämpötilaa lasketaan hetkellisesti jotta alukkeet pystyvät kiinnittymään juosteisiin. Pidennysreaktiossa lämpötilaa nostetaan, jolloin DNA-polymeraasi alkaa liittää nukleotideja alukkeen 3'-päästä lähtien juosteeseen, jolloin kummallekin nauhalle syntyy vastin-nauha. Tämän jälkeen lämpötilaa taas nostetaan jotta saadaan uusi denaturointi. Yhden syklin aikana DNA-nauhat kaksinkertaistuvat. (Suominen ym, 1997, 107-108)

Kvantitatiivisessa PCR:ssä fluoresoiva väri on mukana jo itse reaktiossa. Fluoresenssi suurenee samassa suhteessa kertyvän PCR-tuotteen kanssa. Näytteessä alun perin ennen PCR-reaktiota olleiden DNA-vastinjuosteiden pitoisuus on käänteisesti suhteessa siihen PCR syklien lukumäärään, missä fluoresenssi ylittää sovitun kynnysarvon. (Knuutila ym. 2007, 126-128.) qPCR on erittäin herkkä menetelmä ja pienetkin muutokset käsittelyssä tai PCR-oloissa voivat muuttaa lopputulosta erittäin paljon. Näin ollen on kehitetty erilaisia määritysmenetelmiä; suhteellinen ja absoluuttinen. Suhteellisessa kvantifioinnissa mitataan kohdegeenin ja kontrolligeenin suhdetta ja verrataan sitä erillisestä standardista mitattuun suhteeseen. Absoluuttisessa kvantifioinnissa mitataan sekä kohdegeenistä että kontrolligeenistä kopiokopioita erillisen ulkoisen standardin avulla. (Suominen ym. 2010, 169-170; Absolute vs Relative Quantification, 2012.)

Taqman-qPCR-menetelmissä hyödynnetään reaktioseoksessa olevia fluoresoivia reporttereja sekä vaimentimia. Nämä kiinnittyvät monistettavalle alueelle ennen alukkeita. Vaimennin sijoittuu juosteen 3' päähän vaimentaen 5' päähän sijoittuneen reportterin. DNA-polymeraasin päästessä vaimentimen kohdalle fluoresoiva leima

irtautuu oligonukleotidista ja reportterin signaali voidaan mitata. (Heid ym. 1996, 986-994)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoitus on validoida luotettava kvantitatiiviseen PCR-menetelmään perustuva kimerismitutkimus. Menetelmä tulee TYKSLAB osaston 931 Molekyyli­genetiikan laboratorion käyttöön tulevaisuudessa. Tavoitteena on helpottaa ja nopeuttaa kantasolusiirre­potilaiden hoidon jälkeistä seurantaa mahdollisen relapsin ennakoimiseksi. Validoinnilla varmistutaan siitä, että menetelmä soveltuu laboratorion käyttötarkoitukseen ja että sillä saadut tulokset ovat luotettavia.

Tutkimusongelmat olivat:

- 1. Onko menetelmän herkkyys aiemmin käytettyä menetelmää parempi kimerismin seurannassa?*
- 2. Onko menetelmän tarkkuus yhtä hyvä kuin aiemmin käytetyllä menetelmällä?*
- 3. Soveltuuko menetelmä molekyyli­genetiikan laboratorion käyttöön?*

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

4.1 Tutkimuksen kulku

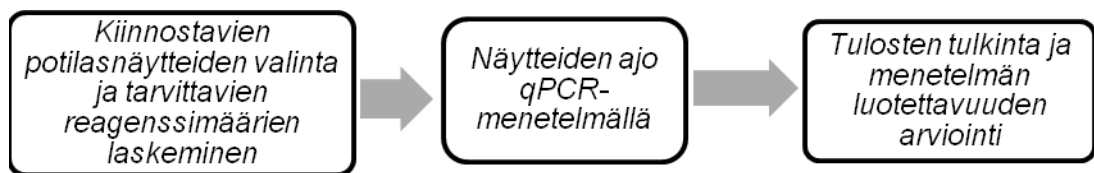
Tutkimus aloitettiin perehtymällä menetelmän ohjemateriaaleihin. Tutustuminen ja perehtyminen itse menetelmään tapahtuivat Abbot Molecularin asiantuntijoiden ("field application specialist") Thomas Janungerin ja Paul Kylan johdolla. Tutkimuksen eteneminen tästä eteenpäin on kuvattuna kuviossa 1.

Potilasnäytteistä valittiin yksitoista tutkimuksen kannalta kiinnostavinta potilasta ja laskemalla reagenssikulutukset näyteajojen maksimoimiseksi. Näytteet valittiin aiempien kimerismitutkimusten tulosten perusteella. Kaikki tutkimukseen valitut potilaat olivat saaneet kantasolusiirteen ja olivat seurantavaiheessa. Näin pystyttiin helposti vertailemaan vanhan ja uuden menetelmän tulostasoa.

Tutkimuksessa testattiin yhteensä yhdeksänkymmentäyksi näytettä yhdeltätoista saaja/luovuttaja-parilta ja yhteensä kolmellakymmenelläneljällä eri markkerilla. Näytteistä 55 oli kokoverestä eristettyä DNA:ta, 17 CD34-positiivista luuytimen soluista eristettyä DNA:ta ja 17 T-solujen DNA:ta. Näytteistä 2 oli sukulaisnäytteitä ja loput 8 olivat rekisteröityjä luovuttajia. Kaikki näytteet olivat valmiiksi eristettyinä ja pakastettuna -20C:ssä säilyvyyden takaamiseksi. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat rutiinidiagnostiikasta ylijääneitä näytteitä.

Seuraavaksi ajettiin kullekin potilaalle oma screening-testi, jossa määriteltiin markkerit joiden alleelikombinaatio poikkeaa saajan ja luovuttajan näytteissä. Screeningin perusteella valittiin saajalle spesifinen markkeri, jota käytettiin kvantifiointissa.

Ajot ajettiin AlleleSEQR-ohjelmalla joka oli yhteydessä ABI-7500 qPCR-analyysilaitteeseen. Jokaisessa ajossa oli mukana negatiivinen kontrolli ja potilaan ensimmäinen diagnostinen näyte. Kontrolli oli ajoissa mukana tulosten luotettavuuden takaamiseksi. Potilaan ensimmäinen näyte toimi referenssinäytteenä joihin verrattiin muiden näytteiden pitoisuuksia.



Kuvio 1. Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Tutkimuksessa on kokeellisia, kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia piirteitä. Ennen tutkimuksen aloittamista koejärjestelyt on suunniteltava ja on valittava tietty joukko jota tutkitaan. Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen voidaan nähdä toisiaan täydentävänä. Kvalitatiivisia menetelmiä voidaan käyttää varmistaakseen mitattavien seikkojen tarkoituksen mukaisuutta tutkimuksen kannalta. Kokeellisena piirteenä voidaan pitää näytteiden valikoimista tietyistä joukosta, sekä näytteiden analysointi muuttujien alaisuudessa. Validoinnissa on tärkeää ensin varmistaa menetelmän toimivuus pienellä joukolla ja vasta sen jälkeen aloittaa datan keruu. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134-136.)

Tutkimuksen tarkoituksena on validoida uuteen mittausperiaatteeseen perustuva menetelmä käyttäen vertailukohtana aiemmin käytetyllä metodilla tuotettuja tuloksia. Sekä uuden että aiemman mittausmenetelmän tuottamat tulokset ovat kvantitatiivisia. Kokeellista vertailua ja validointia varten valittiin joukko aiemmin tutkittuja näytteitä, jotka tutkittiin uudestaan uudella menetelmällä. Ennen lopullista selvitystä, tutkittiin ensin pieni otos näytteitä, joiden avulla varmistettiin menetelmän toimivuus.

4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökulmien tarkastelu

Leukemiat ovat erittäin vaikeita tauteja joissa on huono ennuste. Laboratoriotutkimukset ovat erittäin keskeisiä taudin diagnostiikassa ja hoidossa, jonka vuoksi kliinisissä laboratorioissa pyritään jatkuvaan tutkimusten laadun parantamiseen. Kimerismiasteen määrittäminen potilaan näytteestä mahdollisimman tarkasti on tärkeää. Pienikin solupopulaatio voi nostaa taudin mahdollisen relapoitumisen riskiä. Tuloksen saaminen nopeasti nopeuttaa potilaan hoidon suunnittelua jatkossa ja vaikuttaa positiivisesti potilaan ennusteeseen.

Lain lääketieteellisestä tutkimuksesta (488/1999) mukaan tietoja toisen henkilön ominaisuuksista, terveydentilasta, henkilökohtaisista oloista jotka on mahdollisesti saatu näytteistä, ei saa kertoa sivullisille. Näytemateriaalin tietosuojaa ei vaarannettu työn suoritusvaiheessa eikä raportointivaiheessa. Terveydenhuollon päämääränä on terveyden edistäminen, sairauksien ehkäisy ja hoito sekä kärsimyksen lievittäminen. Näitä perusperiaatteita on noudatettu ja vaalittu myös tässä tutkimuksessa.

Kaikki tulokset käsiteltiin sellaisinaan. Mitään tuloksia ei poistettu tulostason muuttamiseksi tai tulkintojen vääristämiseksi. Näyteajoja uusittiin vain, jos kontrollinäytteiden tulokset olivat poikkeavat.

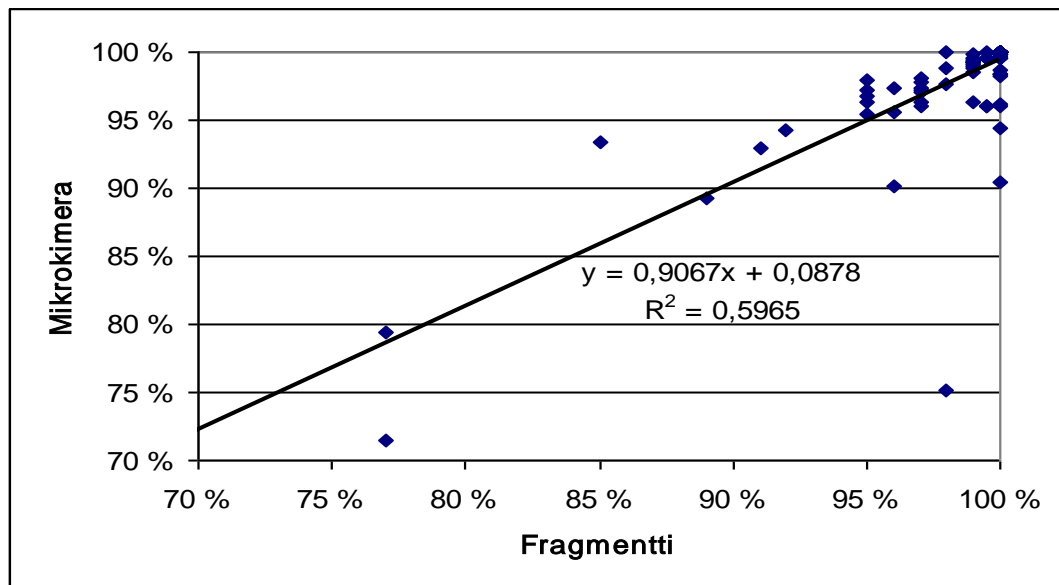
5 TULOKSET

Tutkimuksessa onnistuttiin saavuttamaan menetelmävalmistajan teoreettinen sensitiivisyys. Menetelmä on riippuvainen näytemateriaalin laadusta. Näytteen heikentyessä ei ole mahdollista päästä yhtä sensitiivisiin tuloksiin. Osa näytteistä oli eristettyjä CD34- ja T-Soluja, joten näissä tapauksissa DNA-eristykseen saatiin huomattavasti kokoverinäytettä niukemmin soluja, ja eristetyn DNA:n pitoisuus voi olla huomattavasti heikompi runsaammasta solumäärästä eristettyyn DNA-näytteeseen verrattuna. Tämä saattaa selittää muutaman potilaan heittelevän tulostason. Taulukossa 1. on esitetty tarkemmin menetelmän herkkyydet eri DNA-määriä.

Input DNA amount (ng)	Approximate cell equivalents (assume 6 pg DNA/cell)	Theoretical sensitivity limit for detection of a heterozygous minor component allele	Theoretical sensitivity limit for detection of a homozygous minor component allele
250	41700	0,02 %	0,01 %
100	16700	0,06 %	0,03 %
25	4170	0,24 %	0,12 %
10	1670	0,60 %	0,30 %
2,5	417	2,40 %	1,20 %
1	167	6,00 %	3,00 %

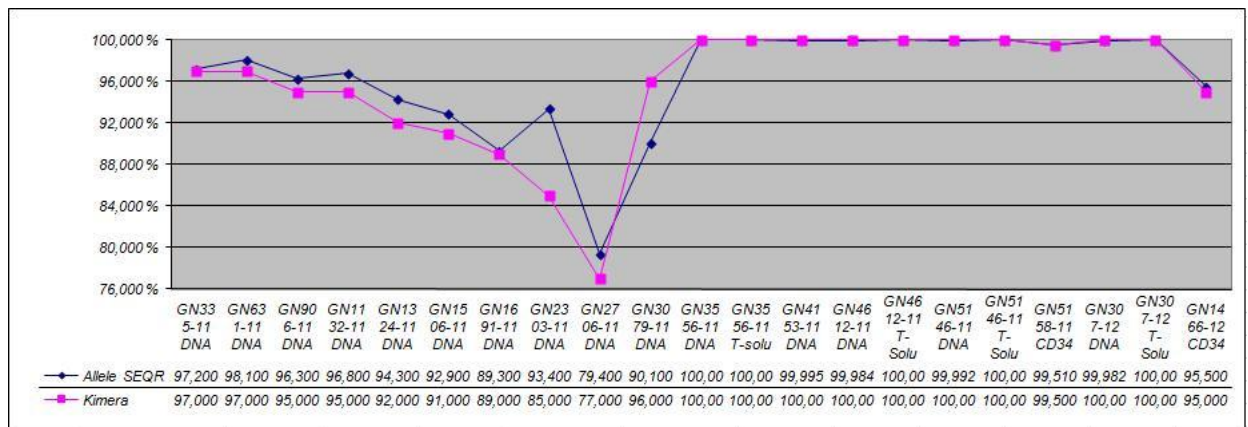
Taulukko 1. Menetelmän teoreettiset herkkyydet

Kaaviossa on esitettyä kaikki saadut tulokset ja verrattu niitä käytössä olevan menetelmän kanssa. Tulokset korreloivat hyvin. Suoralta poikkeavat näytteet pystyttiin selittämään näytemateriaalin laadulla.



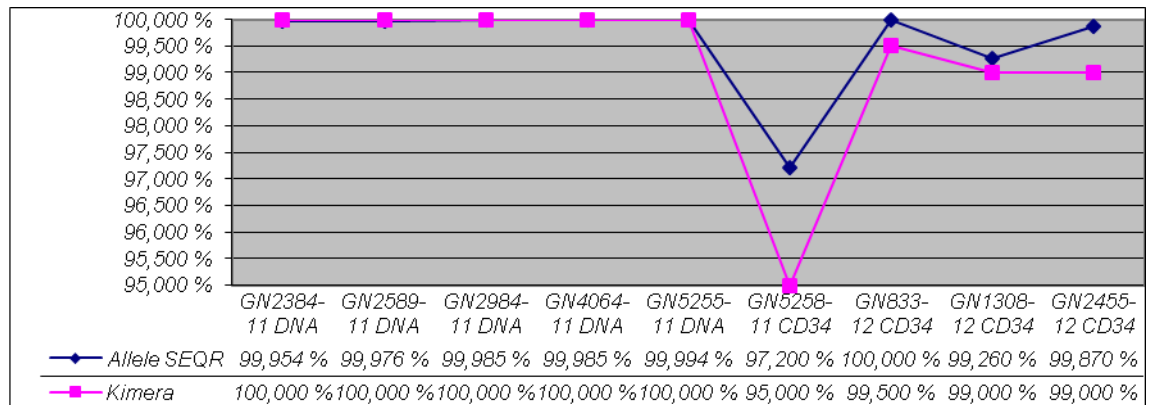
Kuvio 2. Regressiosuora kaikista tuloksista

Potilaan 2. ajoissa mikroimera on antanut korkeampia tuloksia kuin käytössä oleva menetelmä, tulokset ovat kuitenkin olleet samankaltaisia. CD34-soluista sekakimerismiä oli havaittavissa molemmilla menetelmillä.



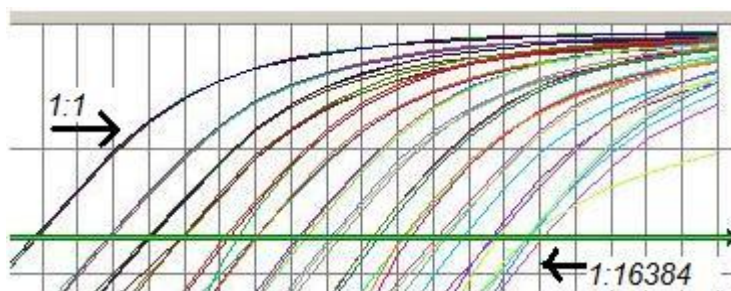
Kuvio 3. Potilaan 2 tulokset

Potilaan 4. ajoista näkee selkeästi mikrokimeran herkkyyden. Perinteinen mikrosatelliittimenetelmä on toistuvasti antanut tulokseksi täyttä luovuttajan kimerismiä. Todellisuudessa kuitenkin potilaalla on ollut jatkuva sekakimerismi. CD34-näytteissä tuloksissa havaittavissa enemmän vaihtelua johtuen niukasta DNA:n määrästä.



Kuvio 4. Potilaan 4 tulokset

Neljännestä potilaasta tehtiin ylimääräinen laimennossarja menetelmän sensitiivisyyden testaamiseksi. Sarjassa laimennettiin saajan DNA:ta luovuttajan DNA:lla ja näin valmistettiin laimennokset välille 1:1 – 1:16 384. Laimennossarja onnistui erinomaisesti ja tulokset olivat odotetun mukaiset. Näytteen pitoisuus laski kussakin laimennoksessa puoleen. Laimennoksella 1:16 384 saatu tulos oli 0,0023 %. Menetelmä on näin ollen erittäin sensitiivinen pienilläkin pitoisuuksilla. (Kuva 1.)

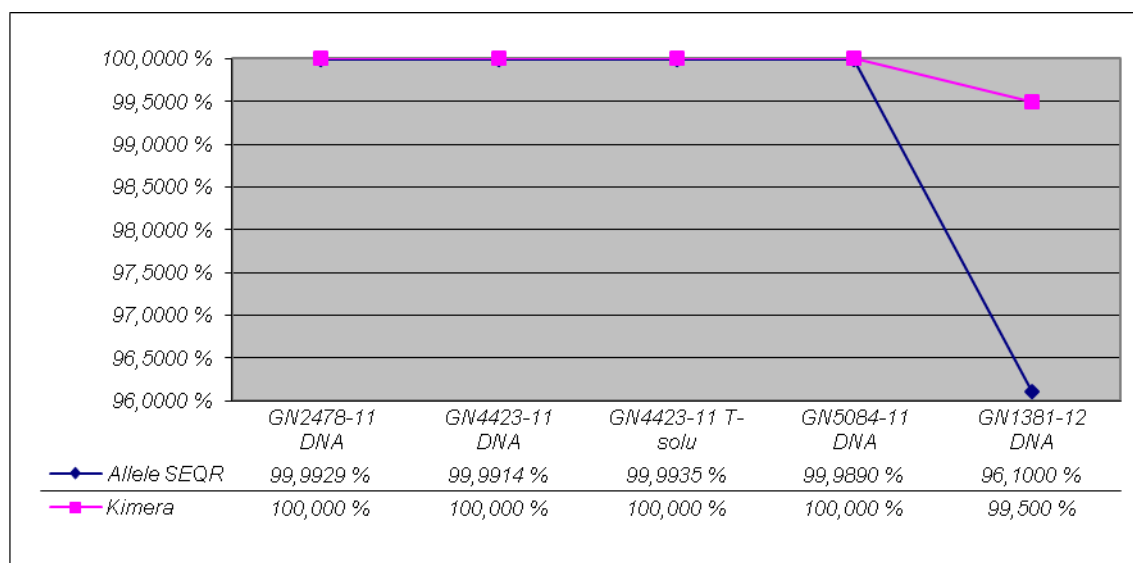


Kuva 1. Laimennossarja

Laimennos	Tulos
1:4	13,2000 %
1:8	4,7000 %
1:16	2,5000 %
1:32	0,9400 %
1:64	0,5700 %
1:128	0,2300 %
1:256	0,1300 %
1:512	0,0580 %
1:1024	0,0310 %
1:2048	0,0150 %
1:4096	0,0072 %
1:8192	0,0032 %
1:16384	0,0023 %

Taulukko 2. Laimennossarjan tulokset

Potilaan 6. tulokset ovat hyvä esimerkki menetelmän toistettavuudesta. Näytteet ajettiin käyttäen samoja reagensseja. Mitattavat pitoisuudet näytteessä olivat erittäin pieniä. Pienin pitoisuus näytteessä oli 0,0065 %, eli paremmin kuin menetelmälle annetut teoreettiset arvot. Tulokset molemmissa ajoissa olivat hyvin lähellä toisiaan, kaikissa tapauksissa alle kaksinkertaisen eron etäisyydellä toisistaan. Käytössä olevan menetelmän mukaan näytteessä olisi vallinnut luovuttajan täyskimerismi, lukuun ottamatta viimeisintä näytettä.

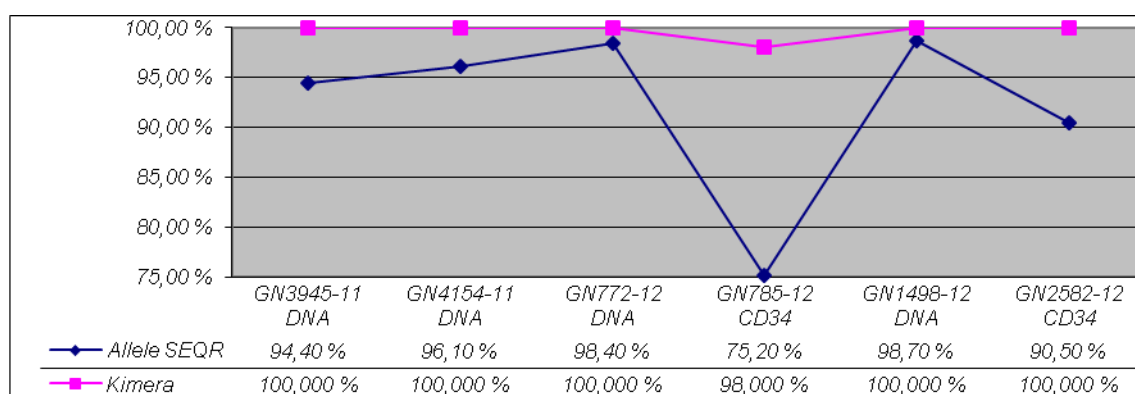


Kuvio 5. Potilaan 6 tulokset

1. Ajo	2. Ajo
0,0071 %	0,0083 %
0,0086 %	0,0066 %
0,0065 %	0,0110 %
0,0110 %	0,0093 %
3,9000 %	4,0000 %

Taulukko 3. Rinnakkaisajojen tulokset

Potilaan 11 tuloksissa saatiin suurimmat vaihtelut. Mikrokimera antoi toistuvasti huomattavasti pienempiä tuloksia kuin fragmenttianalyysillä saadut.



Kuvio 6. Potilaan 11 tulokset

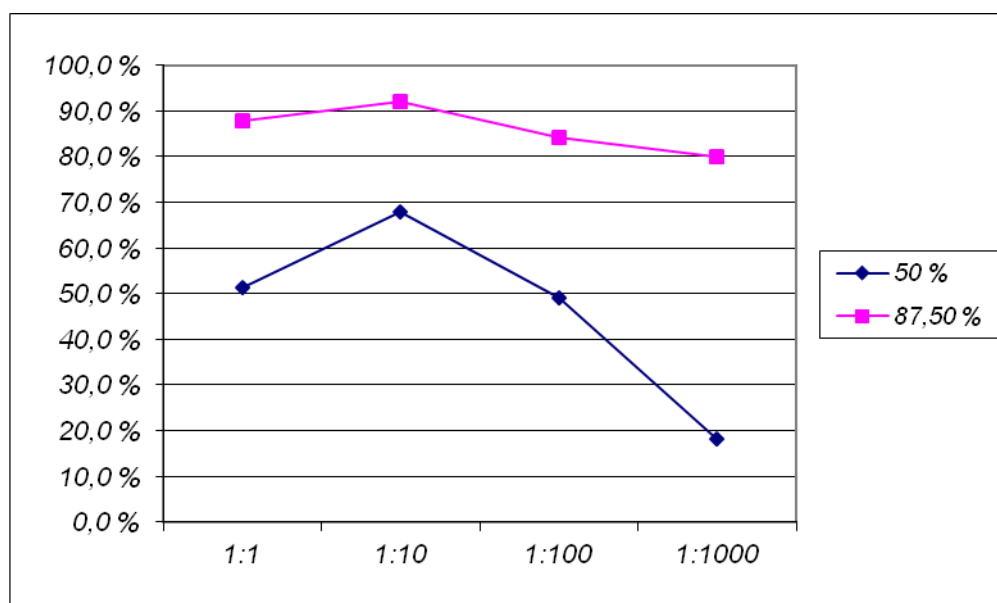
Potilaan 11 näytettä tutkittiin lisää sekoittamalla luovuttajan ja saajan näytettä. Näin saatiin keinotekoisesti valmistettua kimeratuloksia välille 50 % -99,8 %. Niistä tehtiin laimennokset jotka tutkittiin ABL-alukkeilla. Tulosten mukaan nostettiin PCR-syklejä varsinaisessa fragmenttianalyysissä. PCR tehtiin laimentamattomille ja laimennetuille näytteille D18S51- ja D19S253-alukepareilla. Saadut PCR-tuotteet analysoitiin ABI3500DX-kapillaari-elektroforeesilaitteella. Tarkoituksena oli varmistaa alkuperäisen kimeratuloksen oikeellisuus.

Ylimääräisen kimeratestauksen tulokset olivat linjassa vanhojen tulosten kanssa. Heikompiin näytepitoisuuksiin mentäessä tulokset alkoivat vaihdella enemmän. Potilaan 11 mikrokimera-ajossa olleet CD34-selekoidut solut tutkittiin hyvin vähäisestä DNA määrästä. Pipetoinnissa on voinut myös tapahtua virhe ja pitoisuus jäänyt haluttua pienemmäksi. Näyttemateriaalin pitoisuuden heikentyessä, tuloksissa alkaa esiintyä enemmän hajontaa. (Kuvio 7. ja 8.) Se

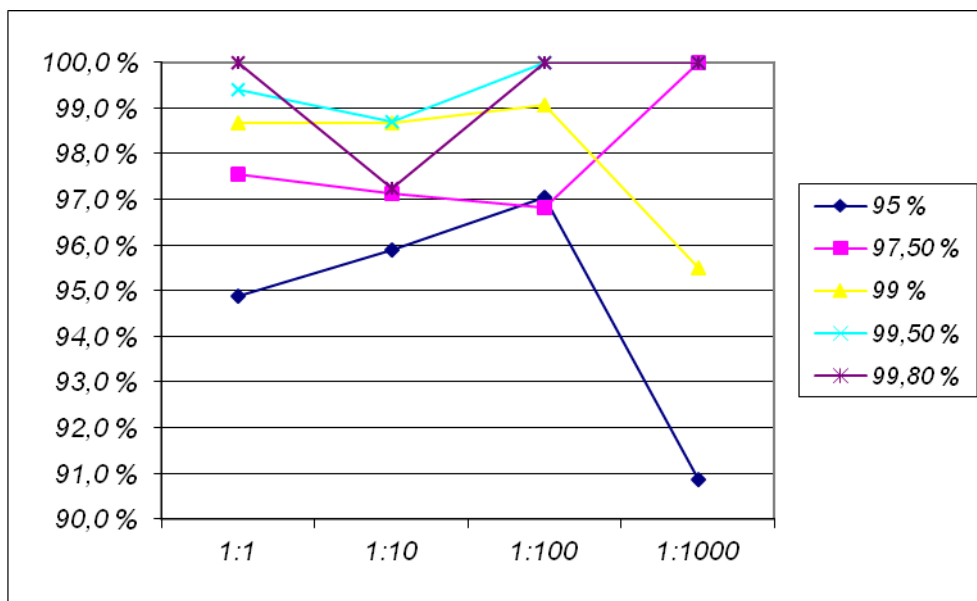
voi osin selittää joidenkin näytteiden poikkeavia tuloksia. Menetelmän herkkyys on riippuvainen analyysissä tutkittavan DNA:n määrästä. (Kaavio 1.)

	50% osuus	87,5% osuus	95% osuus	97,5% osuus	99% osuus	99,5% osuus	99,8% osuus
1:1	51,2 %	87,9 %	94,9 %	97,5 %	98,7 %	99,4 %	100,0 %
1:10	67,9 %	91,9 %	95,9 %	97,1 %	98,7 %	98,7 %	97,2 %
1:100	49,2 %	84,3 %	97,1 %	96,8 %	99,1 %	100,0 %	100,0 %
1:1000	18,2 %	79,8 %	90,9 %	100,0 %	95,5 %	100,0 %	100,0 %

Taulukko 4. Potilaan 11 fragmenttianalyysin tulokset



Kuvio 7. Potilaan 11. Saajan ja luovuttajan DNA:sta on valmistettu sekoitussuhteet 50% ja 87,5%. Näitä DNA-sekoituksia tutkittiin sen jälkeen laimennostasoilla 100%, 10%, 1% ja 0,1%. Kuvassa samaa sekoitussuhdetta eri DNA-pitoisuuksilla edustavat näytteet on yhdistetty toisiinsa viivalla.



Kuvio 8. Potilaan 11. Saajan ja luovuttajan DNA:sta on valmistettu sekoitussuhteet 95%, 97,5%, 99%, 99,5% ja 99,8%. Näitä DNA-sekoituksia tutkittiin sen jälkeen laimennostasoilla 100%, 10%, 1% ja 0,1%. Kuvassa samaa sekoitussuhdetta eri DNA-pitoisuuksilla edustavat näytteet on yhdistetty toisiinsa viivalla.

Potilasnäytteistä uusittiin satunnaisesti valittuja näytteitä ja verrattiin aikaisempiin tuloksiin. Ainoastaan potilaan 11 ajoissa oli havaittavissa satunnaisia poikkeamia.. Kaikista muista näytteistä saadut tulokset olivat hyvin lähellä fragmenttianalyysillä saatuja tuloksia. Useissa näytteissä fragmenttianalyysillä saatu 100 % -tulos oli mikrokimeralla mitattuna hieman alle 100 %, eli siirteen saajan omia soluja oli vielä näissä tapauksissa mikrokimeramenetelmällä osoitettavissa. Löydös viittaa siihen, että mikrokimera on herkempi menetelmä kuin vanha fragmenttianalyysi.

6 POHDINNAT

Menetelmä oli erittäin sensitiivinen ja sillä päästiin tavoiteltuun 0,01% herkkyYTEEN. Tulokset korreloivat hyvin käytössä olevan mikrosatelliittianalyysin kanssa. Useista 100% luovuttajan kimeranäytteistä oli osoitettavissa pieni mikrosekakimerismi. Näin ollen Allele SEQR kimerismimenetelmä on sensitiivisempi kuin tällä hetkellä käytössä oleva fragmenttianalyysiin perustuva menetelmä.

Menetelmää validoitaessa reagenssit ja laitteet toimivat moitteettomasti. Osa näytesarjoista toistettiin tulosten toistettavuuden määrittämiseksi. Menetelmän käyttö oli helppoa ja alun jälkeen erittäin suoraviivaista. Verrattuna fragmenttianalyysiin tämä menetelmä on huomattavasti nopeampi ja helpompi.

Menetelmä otetaan tulevaisuudessa käyttöön TYKSLABin rutiinidiagnostiikassa. Kyseisellä menetelmällä tulos saadaan aikaisempaa nopeammin, jolloin hoidonkin aloitus nopeutuu.

Menetelmä saatiin tutkimuksessa tuotetun datan perusteella validoitua. Sen herkkyys ja spesifisyys ovat riittävät, ja menetelmä osoittautui myös muilta osin soveltuvaksi klinisen molekyyli-genetiikan laboratorion käyttöön, joten tulokset antavat riittävän vastauksen tämän tutkimuksen alkuperäiseen kysymyksenasetteluun.

LÄHTEET

Absolute vs Relative Quantification. Applied Biosystems 2012. Viitattu 30.10.2012. www.appliedbiosystems.com > Applications & Technologies > qPCR (Real-Time PCR) > Absolute vs Relative Quantification.

Alizadeh M., Bernard M., Danic B., Dauriac C., Birebent B., Lapart C., Lamy T., Prise P., Beauplet A., Bories D., Semana G., Quelvennec E. 2002, Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction, *Blood Journal* 99: 4618-4625.

AML seuranta ja vastearvio. 2012. Viitattu 30.10.2012. www.hematology.fi > Veritaudit > Akuutit leukemiat > AML > Seuranta ja vastearvio.

Bacher U., Haferlach T., Fehse B., Schnittger S., Kröger N. Minimal Residual Disease Diagnostics and Chimerism in the Post-Transplant Period in Acute Myeloid Leukemia. 2011. *The Scientific World Journal*, 11:310–319.

Barrios M., Jimenez-Velasco A., Torres A. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. 2003. *Journal of hematology* 88:801-810.

Borchers S., Provani E., Silvani A., Radrizzani M., Benati C., Dammann E., Krons A., Kontsendorn J., Schmidtke J., Kuehnau W., Neuhoff N., Stadler M., Ciceri F., Bonini C., Ganser A., Hertenstein B., Weissinger E. 2011, Genetically Modified Donor Leukocyte Transfusion and Graft-Versus-Leukemia Effect After Allogeneic Stem Cell Transplantation, *Human Gene Therapy*, 22:829–841.

ETENE 2001. Terveystienhuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet. Viitattu 15.10.2012. www.etene.fi > Julkaisut ja muut aineistot > Julkaisut > 2001

Harris A., Kitko C., Couriel D., Braun T., Choi S., Magenau J., Mineishi S., Pawarode A., Yanik G., Levine J. 2012, Extramedullary relapse of acute myeloid leukemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcomes, *Haematologica e-publish*.

Heid A., Stevens J., Livak K., Williams M. Real Time Quantitative PCR. *Genome research*. 1996, 6:986-994,

Hirsjärvi S., Remes P., & Sajavaara P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Jimenez-Velasco A., Barrios M., Roman-Gomez J., Navarro G., Buno I., Castillejo J., Rodriguez A., Garcia-Gemar G., Torres A., Heiniger A. 2005, Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 19:336–343.

Knuutila S., Kairisto V. & Porkka K. 2007. Syto- ja molekyyli-genetiikka. Teoksessa T. Ruutu, A. Rajamäki, R. Lassila & K. Porkka. (toim.) Veritaudit. Kustannus Oy Duodecim. Helsinki: 112-133.

Koldehoff M., Steckel N., Hlinka M., Beelen D., Elmaagacli A. Quantitative Analysis of Chimerism after Allogeneic Stem Cell Transplantation by Real-Time Polymerase Chain

Reaction with Single Nucleotide Polymorphisms, Standard Tandem Repeats, and Y-Chromosome-Specific Sequences. 2006. American Journal of Hematology 81:735–746.

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488.

Masmas T., Madsen H., Petersen S., Ryder L., Svejgaard A., Alizadeh M., Vindeløv L. 2005, Evaluation and Automation of Hematopoietic Chimerism Analysis Based on Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Biology of Blood and Marrow Transplantation 11:558–566.

Ruutu T. 2007. Kantasolujen siirrot veritautien hoidossa. Teoksessa T. Ruutu, A. Rajamäki, R. Lassila & K. Porkka. (toim.) Veritaudit. Kustannus Oy Duodecim. Helsinki: 492-503.

Suominen I., Ollikka P. 1997. Yhdistelmä DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Hakapaino Oy.

Suominen I., Pärssinen R., Haajanen K. & Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.

Liite 1. Kaikki tulokset luetteloituna

	Fragmentti tulos	Mikrokimera tulos
<i>Potilas 1</i>		
	100,0000 %	99,9210 %
	100,0000 %	99,9150 %
	98,0000 %	98,8000 %
	100,0000 %	99,9880 %
	100,0000 %	99,9900 %
	99,0000 %	98,5000 %
<i>Potilas 2</i>		
	97,0000 %	97,2000 %
	97,0000 %	98,1000 %
	97,0000 %	97,0000 %
	97,0000 %	97,4000 %
	95,0000 %	96,3000 %
	95,0000 %	96,8000 %
	92,0000 %	94,3000 %
	91,0000 %	92,9000 %
	89,0000 %	89,3000 %
	85,0000 %	93,4000 %
	77,0000 %	79,4000 %
	77,0000 %	71,5000 %
	96,0000 %	90,1000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	99,9945 %
	100,0000 %	99,9840 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	99,9918 %
	100,0000 %	100,0000 %
	99,5000 %	99,5100 %
	100,0000 %	99,9820 %
	100,0000 %	100,0000 %
	95,0000 %	95,5000 %
<i>Potilas 3</i>		
	97,0000 %	96,1000 %
	97,0000 %	96,3000 %
	99,0000 %	99,0400 %
	99,0000 %	99,2000 %
	99,0000 %	99,3000 %
	100,0000 %	99,9750 %
	98,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	99,8800 %
	100,0000 %	99,7200 %
	100,0000 %	98,2000 %
	100,0000 %	99,9870 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	99,9949 %
	100,0000 %	100,0000 %

Potilas 4

100,0000 %	99,9540 %
100,0000 %	99,9760 %
100,0000 %	99,9850 %
100,0000 %	99,9850 %
100,0000 %	99,9938 %
95,0000 %	97,2000 %
99,5000 %	100,0000 %
99,0000 %	99,2600 %
99,0000 %	99,8700 %

Potilas 5

100,0000 %	99,9800 %
100,0000 %	99,9760 %
96,0000 %	97,3000 %

Potilas 6

100,0000 %	99,9929 %
100,0000 %	99,9917 %
100,0000 %	99,9914 %
100,0000 %	99,9934 %
100,0000 %	99,9935 %
100,0000 %	99,9890 %
100,0000 %	99,9890 %
100,0000 %	99,9907 %
99,5000 %	96,1000 %
99,5000 %	96,0000 %

Potilas 7

99,0000 %	99,4700 %
99,0000 %	99,6000 %
100,0000 %	99,9020 %
100,0000 %	99,8700 %
100,0000 %	99,9720 %
100,0000 %	99,9790 %
100,0000 %	99,9710 %
100,0000 %	99,9280 %

Potilas 8

99,0000 %	98,8000 %
99,0000 %	99,1900 %
99,5000 %	99,5300 %
99,5000 %	99,5700 %
95,0000 %	98,0000 %
100,0000 %	99,5700 %
100,0000 %	99,5200 %
100,0000 %	99,5400 %
99,0000 %	96,3000 %
97,0000 %	97,8000 %
100,0000 %	99,9926 %
100,0000 %	100,0000 %
100,0000 %	100,0000 %
100,0000 %	100,0000 %
100,0000 %	100,0000 %

<i>Potilas 9</i>		
	100,0000 %	99,9510 %
<i>Potilas 10</i>		
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	98,0000 %	97,7000 %
	100,0000 %	99,9830 %
	100,0000 %	99,9936 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	100,0000 %	100,0000 %
	96,0000 %	95,6000 %
<i>Potilas 11</i>		
	100,0000 %	94,4000 %
	100,0000 %	96,2000 %
	100,0000 %	96,1000 %
	100,0000 %	98,4000 %
	100,0000 %	98,4000 %
	98,0000 %	75,2000 %
	100,0000 %	98,7000 %
	100,0000 %	90,5000 %

Liite 2. Työohje

KIMERISMIANALYYSI

Tausta ja periaate:

Tutkimuksessa kantasolusiirron saajan ja luovuttajan näytteistä tutkitaan alleelikombinaatiot kolmenkymmenenneljän markkerin suhteen. Alleelikombinaatioiltaan sopivimmat markkerit valitaan kvantitointiin. Kvantitoinnissa mitataan tuntemattoman näytteen DNA suhteessa referenssinäytteeseen.

Laitteet:

ABI-7500 kvantitatiivinen PCR-laite.

Suoritus:

Screening-vaihe:

1. Laimennetaan näytteet 0,1 µg/µl
2. Valmistetaan näytteelle 1(saaja) sekä näytteelle 2(luovuttaja) omat MIXit, sekä yksi NTC-kontrolli

MIX: 736,3µl Vesi

185µl 5x PCR master mix

3,7µl DNA

yht. 925µl

NTC: 60µl Aqua

15µl 5x PCR Master Mix

yht. 75µl

3. Molemmat mixit vorteksoidaan hyvin
4. Pipetoidaan 25µl Näyte1:tä (saaja) levyn kuopille A1-C11
5. Pipetoidaan 25µl Näyte2:ta (luovuttaja) levyn kuopille E1-G11
6. Pipetoidaan 25µl NTC-kontrollia levyn kuoppiin C12 ja G12 (Riveille D ja H ei tule mitään)
7. Suljetaan levy kalvolla ja ajetaan AlleleSEQR suite-ohjelmalla.

AlleleSEQR suite-screening ohje:

1. Valitaan aloitusruudusta "New screening test"
2. Täytetään tyhjät kentät. Sample 1 kohtaan saajan näyte ja sample 2 kohtaan luovuttaja.
(platen lot numeroa ei tarvitse täyttää. Ruudun alalaidassa on laskuri, millä voi laskea reaktioon tarvittavat näytevolyymit tarvittaessa.)
3. Painetaan alakulmasta "next" jolloin ohjelma näyttää vielä ohjeet, mixit ja pipetointiohjeet.
4. Painetaan uudestaan "next" laitetaan rastit ruutuihin. "Prepared plate loaded" ja "instrument power on"
5. Painetaan "Run test"-nappia.
6. Ajon jälkeen "Analyze data"-napilla pääsee tarkastelemaan tuloksia ja tallentamaan ne.
7. Tulokset voi tallentaa alareunan "Save as"-napilla tekstitiedostoksi.

Quantitation-vaihe:

Kokoveren DNA:

1. Screening tuloksista katsotaan informatiiviset markerit ja valitaan vähintään yksi niistä. Platelle tulee aina referenssi marker CA999 ja vähintään yksi toinen marker.
2. Tehdään AlleleSEQR-ohjelmalla pipetointi pohjat. Samalla platella voidaan ajaa useampi potilas kerralla, tällöin kukin potilas on oma ryhmänsä. Valitaan pipetoitavien näytteiden määrä ja markereiden määrä. Täytetään tyhjät kentät näytteen tiedoilla (GN-numero ja näyttemateriaali).
3. Valmistetaan mixit kullekin markerille.

MIX: 5µl 5x PCR Master Mix

5µl markeria.

Mixiä tehdään kuoppamäärän mukaan ja lisätään kaksi pipetointi varaksi (n+2)

4. Laimennetaan DNA-näytteet 0,034µg/µl:an, yhtä näytettä tarvitaan 105µl, jolloin yhdessä reaktiossa noin 0,5 µg.
5. Pipetoidaan 10µl mixiä kuoppiin.

6. *Pipetoidaan 15µl näytettä kuoppiin.*
7. *Suljetaan plate kalvolla ja ajetaan AlleleSEQR-ohjelmalla.*

T-solut:

1. *Screening tuloksista katsotaan informatiiviset markerit ja valitaan vähintään yksi niistä. Platelle tulee aina referenssi marker CA999 ja vähintään yksi toinen marker.*
2. *Tehdään AlleleSEQR-ohjelmalla pipetointi pohjat. Samalla platella voidaan ajaa useampi potilas kerralla, tällöin kukin potilas on oma ryhmänsä. Valitaan pipetoitavien näytteiden määrä ja markereiden määrä. Täytetään tyhjät kentät näytteen tiedoilla (GN-numero ja näyttemateriaali).*
3. *Valmistetaan mixit kullekin markerille.*

MIX: 5µl 5x PCR Master Mix

5µl markeria.

Mixiä tehdään kuoppamäärän mukaan ja lisätään kaksi pipetointi varaksi (n+2)

4. *Laimennetaan T-solu-näytteet 0,034µg/µl:an, yhtä näytettä tarvitaan 105µl, jolloin yhdessä reaktiossa noin 0,5 µg.*
5. *Pipetoidaan 10µl mixiä kuoppiin.*
6. *Pipetoidaan 15µl näytettä kuoppiin.*
7. *Suljetaan plate kalvolla ja ajetaan AlleleSEQR-ohjelmalla.*

CD34-selekoidut solut:

1. *Screening tuloksista katsotaan informatiiviset markerit ja valitaan vähintään yksi niistä. Platelle tulee aina referenssi marker CA999 ja vähintään yksi toinen marker.*
2. *Tehdään AlleleSEQR-ohjelmalla pipetointi pohjat. Samalla platella voidaan ajaa useampi potilas kerralla, tällöin kukin potilas on oma ryhmänsä. Valitaan pipetoitavien näytteiden määrä ja markereiden määrä. Täytetään tyhjät kentät näytteen tiedoilla (GN-numero ja näyttemateriaali).*
3. *Valmistetaan mixit kullekin markerille.*

MIX: 5µl 5x PCR Master Mix

5µl markeria.

Mixiä tehdään kuoppamäärän mukaan ja lisätään kaksi pipetointi varaksi ($n+2$)

4. CD34-soluista saadaan yleensä erittäin niukasti DNA:ta, josta ei riitä näytettä spektrofotometriseen mittaukseen. Näytettä vähintään 2 μ l per kuoppa. Eli 14 μ l CD34 ja 91 μ l aqua. Mitä enemmän näytettä sitä parempi.
5. Pipetoidaan 10 μ l mixiä kuoppiin.
6. Pipetoidaan 15 μ l näytettä kuoppiin.
7. Suljetaan plate kalvolla ja ajetaan AlleleSEQR-ohjelmalla.

Tulkinta:

Screening-vaiheessa haetaan saajalle ja luovuttajalle informatiiviset markkerit. Kvantitointi-vaiheessa käytetään kyseisiä informatiivisia markkereita. Analyysiohjelmisto ilmoittaa tuloksena saajan solujen osuuden näytteessä.

Kliininen merkitys:

Tutkimuksesta saatua tietoa käytetään hyväksi GVL-efektin arvioimisessa ja se voi ohjata hyylintäestolääkitystä.

Näyte:

Näytteet voivat olla tuoreinäytteitä tai pakastettuja näytteitä. Eristetty DNA säilytetään -20 °C:ssa.

Reagenssit:

Screening platet säilytetään huoneenlämmössä, muut reagenssit -20 °C:ssa.

- AlleleSEQR chimerism screening plate.
- AlleleSEQR 5x PCR-Master mix.
- CA001-CA034 ja CA999 assay.

Kirjallisuus:

AlleleSEQR Chimerism Assay operators manual (2010)